体外診断用医薬品　　2014年4月作成（第1版）

承認番号　21200AMZ00627000
MYD-110

この添付文書をよく読んでから使用してください。

サイトメガロウイルス抗原キット

ＣＭＶ抗原「エルエスアイＭ」

●全般的な注意

1．本品は体外診断用医薬品です。それ以外の目的には使用できません。
2．診断・治療効果の判定は、本法を含めて関連する他の検査や臨床症状に基づき医師が総合的に判断してください。
3．添付文書以外の使用方法については保証をいたしません。
4．使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

●形状・構造等（キットの構成）

1．第一抗体
抗ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）pp65 抗原マウスモノクローナル抗体液
2．第二抗体
アルカリホスファターゼ標識抗マウスイムノグロブリンヤギポリクローナル抗体液
3．色素液
ニューフクシン液
4．活性化試薬
亜硝酸ナトリウム溶液
5．基質液
ナフトールＡＳリン酸・ナトリウム塩溶液

●使用目的

白血球中サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）抗原の検出

●測定原理

ＣＭＶ抗原「エルエスアイＭ」は、間接酵素抗体法による免疫染色法に基づいています。ＣＭＶ抗原検出は、患者末梢血白血球（PBL）を分離、サイトスピン後、固定化した検体スライドを用いて３段階に分けて行います。

第１段階は、抗ＣＭＶpp65 抗体と検体スライド上 PBL の核に存在するＣＭＶpp65 抗原との反応です。未反応の抗ＣＭＶpp65 抗体は洗浄により除去されます。第２段階は、アルカリホスファターゼ標識抗マウスイムノグロブリンヤギ抗体との反応です。未反応のアルカリホスファターゼ標識抗マウスイムノグロブリンヤギ抗体は洗浄により除去されます。第３段階は、発色反応です。免疫複合体が生成していれば、PBL の核内に赤～赤紫色の沈着物質が形成されます。最後に、ヘマトキシリンで対比染色後、ＨＳＲ液で封入し、光学顕微鏡下で観察して判定します。

・アルカリホスファターゼ標識化された二次抗体を使用していますので、内因性パーオキシダーゼ（ＰＯＤ）の影響を受けず、顕微鏡下での観察による結果判定が容易です。

●操作上の注意

1．検体はＥＤＴＡ採血管に採取した後直ちに 4℃に保存し、24 時間以内に PBL 分離してください。
2．固定した検体スライドを直ちに免疫染色に使用しない場合は、良く風乾した後、薄板上の乾燥剤とともにアルミ箔で包み、ポリ袋に入れ －70℃以下で保存してください。このスライドは約 1 年間安定です。
3．凍結保存した検体スライドを免疫染色する場合は、室温に戻した後使用してください。
4．サイトスピン終了後、検体スライドは直ちにチャンバーからとりはずし風乾してください。
5．免疫染色中は細胞表面を乾燥させないでください。
6．光学顕微鏡での観察は全視野（スポット全体）を観察の対象としてください。
7．測定は必ず二重測定（Duplicate）で行ってください。一重測定では特に早期診断を目的とした場合、十分な感度が得られない場合があります。
8．用法、用量を遵守してください。用法、用量を変更した場合、十分な感度、及び正確性を得られない場合があります。

●用法・用量（操作方法）

1．試薬の調製方法
1）第一抗体：そのまま使用します。
2）第二抗体：そのまま使用します。
3）色素液：そのまま使用します。
4）活性化試薬：そのまま使用します。
5）基質液：そのまま使用します。
6）末梢血白血球（PBL）分離及び検体スライド調製用試薬
・デキストラン溶液
デキストラン（高分子、ナカライテスク 109-11） 6 gに生理食塩水を加えて 100 mL にします。この溶液は室温で保存し、12 ヵ月以内に使用してください。
・溶血試薬
塩化アンモニウム 8.3 g、炭酸水素カリウム 1 g 及びＥＤＴＡ･2Ｎａ 30 mg に精製水を加えて 1000 mL とし、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液でｐＨ7.4 に調整します。この溶液は 2～8℃で保存し、12 ヵ月以内に使用してください。
・PBL 分離用洗浄液
生理食塩水に非働化ウシ胎児血清 1 mL※を加えて 100 mL にします。この溶液は 2～8℃で保存し、3 ヵ月以内に使用してください。（※ウシ胎児血清の非働化条件：56℃、30 分）
・固定用洗浄液
ダルベッコ PBS（－） 19.2 gに精製水 2000 mL を加えて調製した PBS（室温保存）に非働化ウシ胎児血清を終濃度 1%になるように加えます。この溶液は用時調製してください。
・固定液
シュークロース 4 g、塩化ナトリウム 0.23 g 及び 20%中性緩衝ホルマリン液（ホルムアルデヒド含量 8%；和光純薬 060-01721） 25 mL を PBS に加えて 200 mL にします。この溶液は用時調製してください。
・浸透液
IGEPAL CA-630 1 mL 及びシュークロース 20 g を固定用洗浄液に加えて 200 mL にします。この溶液は用時調製してください。
7）免疫染色用
・免疫染色用洗浄液
塩化ナトリウム 9 g、Tween 20 0.1 mL に精製水を加えて 1000 mL にします。この溶液は室温で保存し、6 ヵ月以内に使用してください。

2．必要な器具・器材・試薬等
1）器材
・サイトスピン装置一式
・冷却低速遠心機
・ウォーターバス
・エアインキュベーター
・光学顕微鏡
・マイクロピペット、ピペット一式

・スライドガラス
・遠心管一式
・血球計算板
・ダコペン（ダコ・ジャパン㈱）
・湿潤箱
・スライドラック
・染色瓶
・カバーガラス

2）試薬

次の試薬はキットに添付されておりませんので、各検査室にてご用意ください。なお、試薬は特級試薬を原料とし、試薬の調製方法に従って調製してください。

・デキストラン（高分子、ナカライテスク 109-11）
・塩化アンモニウム
・炭酸水素カリウム
・ＥＤＴＡ・2Ｎａ
・1Ｎ水酸化ナトリウム溶液
・ウシ胎児血清
・ダルベッコ PBS（－）
・シュークロース
・塩化ナトリウム
・20%中性緩衝ホルマリン液（ホルムアルデヒド含量 8%；和光純薬 060-01721）
・IGEPL CA-630
・Tween 20
・ヘマトキシリン液（ギルヘマトキシリンなど）
・ＨＳＲ液（国際試薬）
・キシレン

3．測定操作法

1）末梢血白血球（PBL）分離と検体スライド調製

・採血法

①ＥＤＴＡ真空採血管（5 mL）に採血します。
②4℃に保存し、24 時間以内に PBL 分離を行います。

・準備

①溶血試薬及び PBL 分離用洗浄液を氷上で冷やします。
②スライドガラスに番号をつけ、サイトスピンにセットします。

・操作法

①全血 4 mL 及びデキストラン溶液 1 mL を遠心管に入れ静かに混和します。
②30℃ウォーターバス中で 15 分間保温します。
③上清をピペットを用いて別の遠心管に移します。
④100～150 ×g、4℃で 6 分間遠心します。
⑤上清をピペットを用いて取り除きます。この時上清を少しだけ残します。
⑥チューブの底を数回指ではじいて、血球を懸濁します。
⑦冷やした溶血試薬 3 mL を加え、転倒混和します。
⑧氷上で 5 分間反応させます。
⑨冷やした PBL 分離用洗浄液 3 mL を加えて溶血反応を停止させます。
⑩100～150 ×g、4℃で 6 分間遠心します。
※溶血反応が不十分な場合は、⑤～⑩を繰り返します。
⑪上清を除去後、チューブの底を数回指ではじいて PBL を懸濁します。
⑫冷やした PBL 分離用洗浄液 5mL を加えて転倒混和します。
⑬100～150 ×g、4℃で 6 分間遠心します。
⑭上清を除去後、チューブの底を数回指ではじいて PBL を懸濁します。
⑮冷やした PBL 分離用洗浄液 2 mL を加えて転倒混和します。
⑯血球計算板を用いて細胞数を計測します。
⑰PBL 分離用洗浄液を適量加え、PBL 濃度を 1.5×10^6 個/mL に調整します。
⑱サイトスピン用サンプルチャンバーに各 0.1 mL ずつ移します。
検体スライドは、1 検体につき 2 枚作製します。
⑲550 rpm、5 分間サイトスピンします。
⑳直ちにスライドガラスを取り外し約 10 分間送風乾燥します。
㉑20～25℃の固定液に 10 分間浸します。
㉒固定用洗浄液で 2 分間× 4 回洗浄します。
㉓20～25℃の浸透液に 5 分間浸します。
㉔固定用洗浄液で 2 分間× 4 回洗浄します。
㉕精製水で簡潔に洗浄します。
㉖調製した検体スライドは、直ちに免疫染色する場合を除いてよく風乾します。

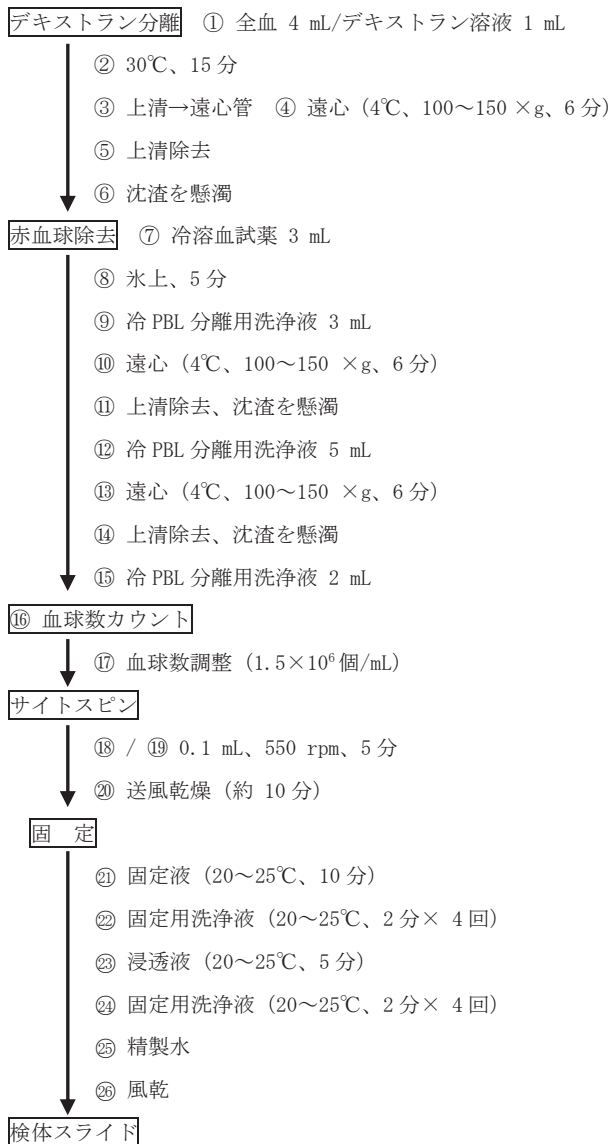
・操作フロー

[デキストラン分離] ① 全血 4 mL/デキストラン溶液 1 mL
↓
② 30℃、15 分
③ 上清→遠心管　④ 遠心（4℃、100～150 ×g、6 分）
⑤ 上清除去
⑥ 沈渣を懸濁

[赤血球除去] ⑦ 冷溶血試薬 3 mL
↓
⑧ 氷上、5 分
⑨ 冷 PBL 分離用洗浄液 3 mL
⑩ 遠心（4℃、100～150 ×g、6 分）
⑪ 上清除去、沈渣を懸濁
⑫ 冷 PBL 分離用洗浄液 5 mL
⑬ 遠心（4℃、100～150 ×g、6 分）
⑭ 上清除去、沈渣を懸濁
⑮ 冷 PBL 分離用洗浄液 2 mL

[⑯ 血球数カウント]
↓
⑰ 血球数調整（1.5×10^6 個/mL）

[サイトスピン]
↓
⑱ / ⑲ 0.1 mL、550 rpm、5 分
⑳ 送風乾燥（約 10 分）

[固　定]
↓
㉑ 固定液（20～25℃、10 分）
㉒ 固定用洗浄液（20～25℃、2 分× 4 回）
㉓ 浸透液（20～25℃、5 分）
㉔ 固定用洗浄液（20～25℃、2 分× 4 回）
㉕ 精製水
㉖ 風乾

[検体スライド]

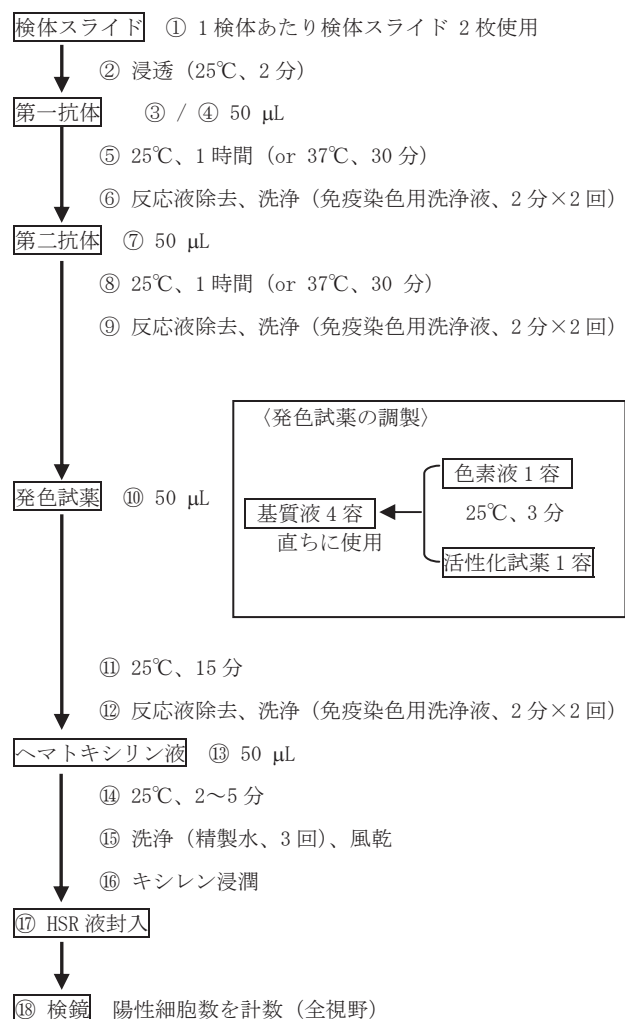
2）免疫染色法

・準備

①検体スライド上のスポットの周囲（スポットの約 2 mm 外側）をダコペンで囲み、ペン跡が乾くまで待ちます。
②湿潤箱を 25℃に放置します（別法で 37℃でも可能）。
③免疫染色用洗浄液を入れた染色瓶を用意します。
④発色試薬を使用直前に以下の手順で調製します。
色素液と活性化試薬を等量混合し、室温で 3 分間反応させます。次に、色素液（又は活性化試薬）の 4 倍容の基質液を加えて攪拌し、直ちに使用します。

・操作法

①免疫染色は二重測定（Duplicate）で行います。
②検体スライドを免疫染色用洗浄液に 2 分間浸します。
※以降免疫染色操作が終了する⑮まで細胞表面を乾燥させないでください。
③洗浄液を軽く切り、スライドをラック上に並べ、湿潤箱の中に静置します。
④第一抗体 50 μL を添加します。
⑤湿潤箱中で 25℃、1 時間反応させます（別法で 37℃、30 分間でも可能）。
⑥細胞に触れないようピペットで反応液を除いた後、免疫染色用洗浄液で 2 分間ずつ 2 回洗浄し、軽く液を切ります。
⑦第二抗体 50 μL を添加します。
⑧湿潤箱中で 25℃、1 時間反応させます（別法で 37℃、30 分間でも可能）。
⑨細胞に触れないようにピペットで反応液を除いた後、免疫染色用洗浄液で 2 分間ずつ 2 回洗浄し、軽く液を切ります。
⑩発色試薬 50 μL を添加します。
⑪湿潤箱中で 25℃、15 分間反応させます。
⑫細胞に触れないようにピペットで反応液を除いた後、免疫染色用洗浄液で 2 分間ずつ 2 回洗浄し、軽く液を切ります。
⑬ヘマトキシリン液 50 μL を添加します。
⑭25℃、2〜5 分間反応させて対比染色します。
⑮精製水で 3 回簡潔に洗浄し良く風乾します。
⑯キシレンに浸します。
⑰ＨＳＲ液で封入します。
⑱光学顕微鏡で全視野を観察します。

・操作フロー

●測定結果の判定法

1．判定法

1）測定を二重測定（Duplicate）で行ったとき、顕微鏡下で少なくとも 1 枚以上のスライドに 1 個以上の赤〜赤紫色の核の特異染色像を呈する陽性細胞を認めた場合、陽性と判定します。

2）測定を二重測定（Duplicate）で行ったとき、顕微鏡下でスライドに赤〜赤紫色の核の特異染色像を呈する陽性細胞をまったく認めない場合、陰性と判定します。

3）白血球分離操作を実施後、所定量の白血球が回収できない場合を判定保留とします。

2．判定上の注意

1）免疫染色操作が正しく行われたかを確認するために、各検査室にてＣＭＶ陽性及び陰性検体を用いた陽性コントロールスライド及び陰性コントロールスライドを作製し使用することをお勧めします。

2）ＣＭＶ抗原「エルエスアイＭ」では、陽性細胞数が白血球 30 万個あたり 1〜2 個程度以下の感度付近の検体では偽陰性を示すことがありますので、ＣＭＶ感染症が強く疑われる場合は繰り返し検査をしてください。

3）検体によっては、まれに検体中の目的成分以外との反応や妨害反応を生じることがあります。測定値や判定結果に疑問がある場合は、再検査や希釈再検査等により確認してください。

4）診断・治療効果の判定は、本法を含めて関連する他の検査や臨床症状に基づき医師が総合的に判断してください。

●性能

1．感度・正確性

陽性コントロールスライドを試験するとき、赤〜赤紫色の核の特異染色像を認めますが、陰性コントロールスライドを試験するとき、核の特異染色像を認めません。

2．同時再現性

陽性及び陰性コントロールスライドをそれぞれ 3 回同時に試験するとき、陽性コントロールスライドでは赤〜赤紫色の核の特異染色像を認めますが、陰性コントロールスライドでは核の特異染色像を認めません。

3．臨床試験

骨髄、腎移植、化学療法中の白血病、及び全身性エリテマトーデス（自己免疫疾患）患者及び健常者から採血した血液から末梢血白血球画分を分離、サイトスピン後、固定化して検体スライドを作製しました。ＣＭＶ抗原「エルエスアイＭ」を用い、所定の操作方法に従って検体スライドを検査しました。あわせて、遺伝子増幅法（ＰＣＲ法）による末梢血白血球中ＤＮＡの検出、シェルバイアル法による尿中ＣＭＶ検出を行いました。

1）骨髄移植 20 症例 194 検体中 32 検体（16%）、腎移植 46 症例 298 検体中 92 検体（31%）、その他（化学療法中の白血病及び全身性エリテマトーデス） 6 症例 9 検体中 3 検体（33%）にＣＭＶ抗原血症を検出し、健常人（ドナーを含む） 34 例はいずれも陰性でした。

2）抗原検査と高感度ＰＣＲ法 [1),2)] の陽性一致率は 112/185（61%）、陰性一致率は 251/257（98%）、全体の一致率は 363/442（82%）でした。不一致例 79 検体（18%）のうち、ＰＣＲのみ陽性は 73 検体（92%）でしたが、これらは、経過観察中、抗原検査よりも先にＰＣＲが陽転した例又は発症前に抗原検査陰性、ＰＣＲ陽性を示した例 21 検体（29%）、抗原検査がＰＣＲよりも先に陰性化した例 32 検体（44%）、経過中、抗原検査がすべて陰性

を示した例 19 検体（26%）等に分類されました。この結果から、抗原検査法は、高感度ＰＣＲ法よりやや低感度ですが、特異的に抗原血症を検出できる方法であると推定できました。

3）抗原検査とシェルバイアル法の陽性一致率は、44/81（54%）、陰性一致率 291/366（80%）、全体の一致率 335/447（75%）でした。不一致例 112 例（25%）のうち、高感度ＰＣＲ法とシェルバイアル法の陽性一致率は 12/75(16%)、陰性一致率は 6/30（20%）でした。これらの結果は、尿を検体とするシェルバイアル法では、ＣＭＶの感染部位の違いを反映すること、ガンシクロビル製剤投与で陰性化しやすく感度が低くなることが考えられました。

4）抗原検査、ＰＣＲと臨床症状の有無の関連を調べた結果、37 症例のうち経過１時点以上の陽性を示したのは、抗原検査 25 症例（68%）、ＰＣＲ 30 症例（81%）でした。発症例は、9 症例（24%）であり、抗原検査、ＰＣＲとも全例検出可能でした。従って、発症例におけるＣＭＶ感染症の診断には、抗原検査はＰＣＲと同様有効であると考えられました。

5）病態との経時的な解析が可能であった発症例 9 例の抗原検査及びＰＣＲの陽転時期はそれぞれ 7.4 日前（1〜15 日前）及び 11.3 日前（1〜21 日前）でした。抗原検査はＰＣＲと同様ＣＭＶ感染症の早期診断法として有用であると考えられました。

6）病態との経時的な解析が可能であった 37 症例中、経過１時点以上の陽性を示したのは、抗原検査 25 症例（68%）、ＰＣＲ 30 症例（81%）であり、発症した 9 症例（24%）は抗原検査、ＰＣＲとも全例陽性でした。従って、抗原検査陽性例における発症率は 9/25（36%）、ＰＣＲ陽性例における発症率は 9/30（30%）でした。ガンシクロビル製剤の発症前投与によると推定される未発症例を除いた場合の抗原検査陽性症例あたりの発症率は 9/21（43%）、ＰＣＲ陽性症例あたりの発症率は 9/27（33%）でした。一方、経過中すべて抗原検査及びＰＣＲ陰性を示した症例の発症率はそれぞれ 0/12（0%）、0/7（0%）でした。このことから、抗原検査は発症予測に有用であると考えられました。

●使用上又は取り扱い上の注意

1．取り扱い上の注意

1）検体は、ＨＢＶ、ＨＩＶ、ＨＣＶ等の感染の恐れがあるものとして取り扱ってください。

2）検査にあたっては、感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用してください。

3）検体については、ゴミ、カビ、細菌類、洗剤等の混入は絶対に避けてください。

4）第一抗体及び第二抗体には、0.1%のアジ化ナトリウムが含まれていますので、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。

2．使用上の注意

1）本品は貯蔵方法に従って保存し、使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。

2）凍結した試薬は使用しないでください。

3）試薬は必ず室温に戻してから使用してください。

4）異なるロットとの組み合わせで使用しないでください。

5）使い残りの試薬の混合は避けてください（汚染や試薬の劣化をきたすことがあります）。

3．廃棄上の注意

1）検体、検査に使用した器具類及び廃液は、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度 1,000 ppm、1 時間以上浸漬）、グルタールアルデヒド溶液（2%、1 時間以上浸漬）等での消毒又はオートクレーブ処理（121℃、20 分以上）を行ってください。

2）第一抗体及び第二抗体には、0.1%のアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは、爆発性の強い金属アジドを生成することがありますので、廃棄は大量の流水で行ってください。その他の試薬を破棄する場合は多量の水で流してください。

3）試薬、検査に使用した器具類及び廃液を廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等に従って、廃棄してください。

●貯蔵方法、有効期間

1．貯蔵方法：2〜8℃（遮光）

2．有効期間：15 ヵ月

●包装

製品番号	包装内容	包装単位
MYD-110 （50 テスト用）	第一抗体	2.7 mL×1 瓶
	第二抗体	2.7 mL×1 瓶
	色素液	1 mL×1 瓶
	活性化試薬	1 mL×1 瓶
	基質液	3 mL×1 瓶

●主要文献

1）浅井隆善　他：今日の移植, 7(6)：553-559, 1994.

2）田辺一成　他：今日の移植, 8(3)：229-235, 1995.

3）TAKASHI KURIHARA et al.：Biomedical Research, 16(2)：125-129, 1995 .

●問い合わせ先

株式会社ＬＳＩメディエンス　インフォメーショングループ
〒101-8517　東京都千代田区内神田一丁目１３番４号
TEL：03－5994－2516
E-mail: medi-ho-service@nm.medience.co.jp

製造販売元
株式会社LSIメディエンス
東京都千代田区内神田一丁目１３番４号